

BUNDE REPUBLIK DEUTSCHLAND

EP 00 / 0 2 8 0 9



REC'D 31 MAY 2000

WIPO PCT

Bescheinigung

4

Die Hoechst Schering AgrEvo GmbH in Berlin/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verfahren zur Herstellung von L-Phosphinothricin durch
enzymatische Transaminierung mit Aspartat"

am 30. April 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole
C 12 P und A 01 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 31. Januar 2000

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Aktenzeichen: 199 19 848.9

Wehner

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Beschreibung

5

Verfahren zur Herstellung von L-Phosphinothricin durch enzymatische Transaminierung mit Aspartat

Die Erfindung betrifft das technische Gebiet der Synthese von Pflanzenschutzmittel-
 10 wirksstoffen, insbesondere die Synthese von L-2-Amino-4-(hydroxymethylphosphinyl)-
 buttersäure (L-Phosphinothricin, L-PPT) aus 4-(Hydroxymethylphosphinyl)-2-oxo-
 buttersäure (HMPB, PPO) durch enzymatische Transaminierung in Gegenwart von
 Aspartat in Gegenwart einer PPO-spezifischen Aspartat-Transaminase (Asp-TA).
 Die Verbindung L-PPT, deren Salze und einige Derivate davon sind herbizid
 15 wirksame nicht-proteinogene Aminosäuren bzw. Salze und Derivate davon (DE-A-
 2717440). Die jeweilige L-Form ist dabei biologisch aktiv, während die jeweilige
 D-Form praktisch unwirksam ist (DE-A-2856260).

Es ist bereits bekannt, daß sich Transaminasen aufgrund ihrer hohen
 20 Stereoselektivität und einer relativ breiten Substratspezifität besonders für die
 chirale, enzymatische Synthese von Aminosäuren aus ihren korrespondierenden
 Ketosäurevorstufen eignen. Ein Nachteil für den technischen Einsatz von
 Transaminasen ist jedoch ihre Gleichgewichtskonstante von ca. 1, so daß das
 gewünschte Produkt im allgemeinen nur in einer 50 % igen Ausbeute entstehen
 25 kann (US-A-4,826,766). In EP-A-0344683 und in US-A-5,221,737 wird die
 Herstellung des herbiziden Wirkstoffs L-Phosphinothricin [(L-Homoalanin-4-yl-
 (methyl)phosphinsäure, L-2-Amino-4-(hydroxymethylphosphinyl)-buttersäure,
 L-PPT]], einer nicht-proteinogenen Aminosäure, durch Transaminierung aus der
 korrespondierenden Ketosäure [(2-Oxo-4-((Hydroxy)(Methyl)Phosphinoyl)-
 30 buttersäure, PPO)] mit 4-Aminobutyrat : 2-Ketoglutarat -Transaminase (GABA-
 Transaminase, EC 2.6.1.19) aus *Escherichia coli* beschrieben. Für eine quantitative
 Umsetzung wird ein hoher molarer Überschuß des Aminodonors Glutamat benötigt,
 was die Aufreinigung des Reaktionsproduktes erschwert.

Eine Lösung dieses Problems ist durch die Verwendung von Aspartat als
 Aminodonor möglich, da die korrespondierende Ketosäure Oxalacetat in wäßrigem
 Milieu instabil ist und spontan zu Pyruvat decarboxyliert. Durch die Entfernung eines
 Reaktionsproduktes aus dem Gleichgewicht kann keine Rückreaktion stattfinden und
 eine quantitative Umsetzung ist auch bei äquimolarem Einsatz von Ketosäure und
 5 Donoraminosäure möglich. Ein solches Verfahren wird z.B. in der EP-A-0135846
 beschrieben.

Die Anwendung dieses Prinzips auf die enzymatische Synthese von L-
 10 Phosphinothricin war jedoch bisher nicht möglich, da die beschriebene GABA-
 Transaminase Aspartat als Aminodonor nicht akzeptiert und auch keine andere
 Transaminase mit gemeinsamer Spezifität für L-Phosphinothricin und Aspartat
 bekannt war.

15 Hilfsweise wurde ein gekoppeltes 2-Enzym-System, bestehend aus PPT-spezifischer
 Transaminase und Glutamat : Oxalacetat - Transaminase (GOT, EC 2.6.1.1)
 vorgeschlagen (EP-A-0249188 und EP-A-0477902). Bei dieser Reaktionsführung
 wird das bei der Synthese von L-PPT verbrauchte Glutamat mittels GOT aus
 Aspartat regeneriert. Die Aspartat-Transaminase selbst hat keine Spezifität für L-
 20 PPT/PPO. Die spontane Umwandlung von Oxalacetat zu Pyruvat führt auch für die
 Gesamtreaktion zu einer Gleichgewichtsverschiebung in Richtung
 L-PPT-Synthese. Dabei sind quantitative Produktausbeuten bei äquimolarem
 Einsatz von PPO und Aspartat und deutlichem Unterschluß von Glutamat möglich.

25 Durch diesen gekoppelten Enzymprozeß kann die Überdosierung der in der
 Substratlösung vorhandenen Donoraminosäuren gegenüber der Akzeptorketosäure
 PPO deutlich vermindert werden, was die Aufarbeitung der Produktlösung
 vereinfacht. Jedoch ist bei der gekoppelten Reaktionsführung weiterhin die
 Verwendung von Glutamat erforderlich, das - im Gleichgewicht mit Ketoglutarat - im
 30 Reaktionsprodukt verbleibt oder durch aufwendige Reinigungsverfahren von der
 strukturell sehr ähnlichen Aminosäure L-PPT abgetrennt werden muß. Außerdem ist



- 

- 



- 



Aspartat bezeichnet vorzugsweise L-Asparaginsäure oder deren Salze, vorzugsweise Alkalimetallsalze. Als Aspartat kann aber auch L-Asparaginsäure in Mischungen mit D-Asparaginsäure, beispielsweise als racemische D,L-Asparaginsäure eingesetzt werden.

Alternativ kann in dem erfindungsgemäßen Verfahren gegebenenfalls vorhandenes Pyruvat aus der Reaktionsmischung physikalisch, chemisch und/oder enzymatisch entfernt werden, vorzugsweise durch Umsetzung mittels enzymatische Katalyse, z.B. durch Acetolactat-Synthase (ALS), Pyruvat-Decarboxylase, Pyruvat-Oxidase, insbesondere Acetolactat-Synthase; ganz besonders bevorzugt erfolgt die Umsetzung von Pyruvat in Gegenwart eines relativ thermostabilen Enzyms. Die so verwendeten Enzyme können gegebenenfalls in immobilisierter Form vorliegen.

Beide Substrate (Donor und Akzeptor) werden beispielsweise in einem molaren Verhältnis von 0,5-2 : 1 (bezogen auf L-Asparaginsäure : PPO) eingesetzt, vorzugsweise 0,75-1,5 : 1, insbesondere etwa äquimolar. Beim Einsatz von Gemischen von L- und D-Asparaginsäuren(salzen) ist die molare Menge von L-Asparaginsäure(salz) maßgebend. PPO-Derivate sind in molaren Mengen entsprechend PPO einzusetzen. Die Anwesenheit von Glutamat in der Substratlösung ist nicht notwendig. Einige der gefundenen Enzyme weisen eine ausgezeichnete Thermostabilität auf. Die Prozeßführung ist daher in einem weiten Temperaturbereich möglich, beispielsweise bei Temperaturen von 10 bis 95°C, vorzugsweise von 40 bis 90°C, insbesondere von 60 bis 85°C. Bei Enzymen, die keine besondere Thermostabilität aufweisen liegt der bevorzugte Temperaturbereich bei 20 bis 70°C, insbesondere bei 30 bis 40°C.

Durch die relativ hohen Temperaturen läßt sich die Reaktionsgeschwindigkeit erheblich beschleunigen, was auch die Umsetzung von konzentrierteren Substratlösungen (10 % ig) mit hohen Raum/Zeit-Ausbeuten ermöglicht. Die Reaktion erfolgt vorzugsweise bei einem pH-Wert im Bereich von 6,5-10,

vorzugsweise von 7 bis 9, insbesondere von 7,5 bis 8,5 in einem entsprechend geeigneten Puffersystem mit einem pKa-Wert im Bereich von 7-9, unter anderem Phosphat- oder Tris-Puffer. Überraschenderweise besitzen die biochemisch näher charakterisierten Enzyme keine Spezifität für GABA und unterscheiden sich somit deutlich von bisher bekannten L-PPT/PPO-spezifischen Transaminasen.

Besonders hohe Konversionsraten lassen sich in der Reaktion erreichen, wenn die Entstehung von Alanin während der Transaminierung vermieden bzw. minimiert werden kann. Zu diesem Zweck können gegebenenfalls optimierte ASP-TA-Varianten ohne Substratspezifität für Pyruvat verwendet werden. Alternativ kann Pyruvat physikalisch, z. B. durch Verwendung selektiv permeabler Membranen und/oder chemisch bzw. enzymatisch, z. B. durch Umsetzung mit Pyruvat-Decarboxylase, Pyruvat-Oxidase oder Acetolactat-Synthase aus dem Reaktionsansatz entfernt werden (siehe z.B. Taylor et al., TIBTECH (1998) vol. 16, 412-418; Fotheringham et al., CHIMICA OGGI/chemistry today (1997), 9/10, 33-38; WO 98/53088).

Die Reinigung des Produkts, L-PPT, aus der Reaktionslösung kann gegebenenfalls nach bekannten und üblichen Verfahren erfolgen, beispielsweise durch Extraktion mit Methylisobutylketon oder über eine Kationenaustauscherchromatographie, z.B. mit Amberlite® IR 120 (Hersteller Sigma).

Das erfindungsgemäße Verfahren wird in den folgenden Beispielen weitergehend erläutert und die Erfindung in den Patentansprüchen definiert. Die nachfolgenden Beispiele sind insofern nicht limitierend zu verstehen.

Beispiele:

- 1.) Isolierung von Bodenmikroorganismen mit L-PPT-spezifischer Aspartat-Transaminase Aktivität:

5

Je 1 g verschiedener Bodenproben (Humus, Lehm, Sand/Schwanheimer Düne, Frankfurt) wurden mit 10 ml 10 mM NaPhosphat-Puffer, pH = 7,0 für 1 h bei Raumtemperatur extrahiert. Aus den Extrakten wurden Anreicherungskulturen in folgendem Medium angeimpft:

10

5 mM Glucose
5 mM Succinat
10 mM Glycerin
10 mM PPO
10 mM L-Asparaginsäure
50 ml/l Lösung A
25 ml/l Lösung B

15

Lösung A: 50 g/l K_3HPO_4

20 Lösung B: 2,5 g/l $MgSO_4$
0,5 g/l NaCl

25 ml/l aus einer Stammlösung
enthaltend:

1 g/l $FeSO_4 \times 7 H_2O$
0,22 g/l $MnSO_4 \times H_2O$
0,1 g/l H_3BO_3
0,1 g/l $Na_2MoO_4 \times 2 H_2O$
0,18 g/l $ZnSO_4 \times 7 H_2O$
0,16 g/l $CuSO_4 \times 5 H_2O$
0,1 g/l $CoCl_2 \times 6 H_2O$
1 ml/l 1 N HCl

30

Die Kulturen wurden für 3-5 Tage bei 28°C und 200 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Aus einer der getesteten Bodenproben (Humus) ließen sich Mikroorganismen anreichern, die mit L-Asparaginsäure als alleiniger N-Quelle wachsen konnten. Die Kultur wurde mehrfach im gleichen Medium weiterpassiert und dann zur Isolierung von Einzelklonen auf Agar-Medium der gleichen Zusammensetzung ausplattiert. Nach Inkubation für 3-5 Tage bei 28°C wurden insgesamt 100 Einzelkolonien isoliert und wieder in Flüssigmedium angeimpft (siehe oben). Die Vereinzelung auf Agar-Platten wurde noch 2 x wiederholt, um die Gewinnung von Reinkulturen sicherzustellen.

5

- 10 Nach diesen Selektionszyklen waren 20 Einzelstämme vorhanden, die mit L-Asparaginsäure als alleiniger N-Quelle wachsen konnten.

Zum Testen auf PPO/Asp-Transaminase-Aktivität wurden je 2 ml Kulturen der Stämme wie oben angezogen. Anschließend wurden je 400 µl der Kulturen mit 0,5 %

- 15 Toluol, 0,5 % Ethanol für 30 min. bei 37°C permeabilisiert. Die Zellpellets wurden in je 50 µl Reaktionsmix bestehend aus 50 mM PPO, 50 mM L-Asparaginsäure, 50 mM Tris/HCl, pH = 8,0, 10 µM Pyridoxalphosphat resuspendiert und über Nacht bei 28°C inkubiert.

- 20 Zur qualitativen Bestimmung des gebildeten PPT wurden die Reaktionsüberstände 1:5 in Wasser verdünnt und davon je 5 µl durch Dünnschichtchromatographie auf HPTLC-Zellulose-Platten (Merck) mit n-Butanol : Eisessig : Wasser = 60 : 15 : 25 Laufmittel analysiert. Die Aminosäuren wurden durch Ninhydrin-Färbung visualisiert.

- 25 Bei 4 Stämmen (HT2, HT5, HT11, HT18) konnte die Bildung von Phosphinothricin nachgewiesen werden. Die Enantiomerenreinheit des Reaktionsproduktes wurde durch chirale HPLC [mit der Trennsäule Chirex® (D) mit Penicillamin als Matrix (Hersteller Phenomenex) untersucht] (Laufmittel: 2 mM $CuSO_4$, 10 % Methanol, Flußrate: 0,5 ml/min., UV-Detektion: 254 nm, Retentionszeiten: L-PPT: ca. 17 min., D-PPT: ca. 21 min.). In allen 4 untersuchten Testproben konnte hierdurch L-PPT und kein D-PPT als Reaktionsprodukt nachgewiesen werden.

2.) Nachweis der direkten PPO/Aspartat-Transaminierung mit Transaminase-Enzympräparaten:

- 5 Insgesamt 7 verschiedene, kommerziell erhältliche Transaminasen wurden auf PPO/Aspartat-Transaminierung getestet aus Mikroorganismen stammende (thermostabile Transaminasen AMN-001-01, -001-02, -001-03, -001-04, -001-05, enthalten in den Aminotransferase-Testkit von Diversa CAT# AMN-001 (1998); Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), Sigma). Die Enzympräparate wurden mit einer Proteinkonzentration von 5 mg/ml in 50 mM Tris/HCl-Puffer, pH = 8,0 gelöst und anschließend über Nacht bei 4°C gegen den gleichen Puffer dialysiert. Dadurch sollten in den Enzympräparationen möglicherweise vorhandene Aminodonoren und -akzeptoren, die als Zwischenüberträger bei der Transaminierung fungieren könnten, entfernt werden.
- 15 Die Enzymlösungen wurden anschließend auf 1 mg/ml eingestellt und in 50 µl Ansätzen mit Reaktionspuffer bestehend aus 50 mM PPO, 50 mM L-Asparaginsäure, 50 mM Tris/HCl, pH = 8,0, 10 µM Pyridoxalphosphat für 1 h bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur inkubiert.

- 20 Die Enzymtests wurden durch Dünnschichtchromatographie und chirale HPLC, wie in Beispiel 1 beschrieben, analysiert. Bei 2 der thermostabilen Enzyme, AMN-001-03 und AMN-001-04 (Reaktionstemperatur: 80°C), konnte die enantioselektive Bildung von L-PPT durch Transaminierung aus L-Asparaginsäure nachgewiesen werden. Alle anderen getesteten Enzyme zeigten keine Reaktivität.

- 3.) Quantitative Untersuchung der PPO/Aspartat-Transaminierung mit der thermostabilen Transaminase AMN-001-03:

Aufgrund der höheren spezifischen Aktivität wurde die Transaminase AMN-001-03 für die genauere Charakterisierung der L-PPT-Synthese-Reaktion ausgewählt. 1 ml einer Substratlösung bestehend aus 40 mM PPO, 48 mM L-Asparaginsäure, 50 mM Tris/HCl, pH = 8,0, 0,1 mM Pyridoxalphosphat wurden mit 1 mg Transaminase AMN-001-03 bei 80°C inkubiert. Zur Analyse des Reaktionsverlaufs wurden über einen Zeitraum von 24 h je 50 µl Aliquots abgenommen und bei -20°C eingefroren. PPT und Aspartat wurden im Aminosäureanalysator (Biotronic LC 5001) bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt. Unter den gewählten Bedingungen wurde das Reaktionsgleichgewicht der L-PPT-Synthese nach 2-4 h erreicht. Der eingesetzte Aminodonor L-Asparaginsäure war nach 7 h vollständig verbraucht. Es wurde eine Konversionsrate [produziertes L-PPT/PPO im Substrat x 100] von ca. 75 % erzielt.

15

Tabelle 1: Reaktionsverlauf der PPO/Aspartat-Transaminierung mit Transaminase AMN-001-03

Reaktionszeit [h]*	L-PPT [mM]	Aspartat [mM]
0	0	53,4
1	9,5	47,8
2	20,8	33,8
4	25,7	12,5
7	29,7	0
24	28,1	0,4

20 *: Reaktionstemperatur: 80°C

4.) Enzymatische, chirale Synthese von L-PPT aus PPO und Aspartat mit partiell gereinigter thermostabiler Transaminase AMN-001-03:

Für die Syntheseversuche wurde partiell gereinigte Transaminase AMN-001-03 mit einer spezifischen Aktivität von 107 nkat/mg Protein (1 nkat = 1 nmol Aspartat/sec.) eingesetzt. Die Reaktionslösung mit einem Volumen von 1 ml enthielt 552 mM PPO (10 %), 700 mM L-Asparaginsäure, 0,1 mM Pyridoxalphosphat, pH = 8,0, eingestellt mit KHCO_3 und 11,5 mg Enzym. Der Ansatz wurde bei 80°C inkubiert. Probenabnahme und Analytik erfolgten wie in Beispiel 3 beschrieben.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefasst. In diesem Versuch war das Reaktionsgleichgewicht bereits nach 1 h erreicht. Der Aminodonor L-Asparaginsäure war nach 4 h nahezu vollständig verbraucht. Die Konversionsrate betrug ca. 52 % und die Raum/Zeit-Ausbeute lag bei 4,5 [g L-PPT/g Biokatalysator/ h]. In einem Parallelversuch mit gleicher Substratlösung und Enzymkonzentration aber einer Reaktionstemperatur von 60°C, wurde eine ähnliche Konversionsrate bei allerdings deutlich verminderter Reaktionsgeschwindigkeit erreicht. Die Raum/Zeit-Ausbeute betrug nur 0,95 [g L-PPT/g Biokatalysator/h]. Diese Ergebnisse belegen die große Bedeutung der hohen Temperaturstabilität der Transaminase für die Umsatzrate und eine effektive Reaktionsführung.

Die nur mäßige Konversionsrate von 52 % ist hauptsächlich auf die Bildung des Nebenproduktes Alanin durch Transaminierung von Pyruvat zurückzuführen. Wesentlich höhere Konversionsraten lassen sich erreichen, wenn die Entstehung von Alanin während der Reaktion vermieden wird.

Tabelle 2: Herstellung von L-PPT durch Transaminierung mit partiell gereinigter thermostabiler Transaminase AMN-001-03

Reaktionszeit [h]*	L-PPT [mM]	Aspartat [mM]	Alanin [mM]
0	0	700,0	0
0,5	155,3	405,8	0
1	286,4	193,1	98,7
2	288,5	15,2	181,5
4	284,0	1,9	284,1
8	251,9	1,3	234,5

*: Reaktionstemperatur: 80°C

3. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß die akzeptor-spezifischen Aspartat-Transaminasen eine geringe Substratspezifität für Pyruvat aufweisen, so daß die Bildung des Nebenprodukts Alanin möglichst vermieden wird.

- 5



10



15

- gekennzeichnet, daß ein oder mehrere der Transaminasen in immobilisierter Form vorliegen.

3. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß die akzeptor-spezifischen Aspartat-Transaminasen eine geringe Substratspezifität für Pyruvat aufweisen, so daß die Bildung des Nebenprodukts Alanin möglichst vermieden wird.
4. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß vorhandenes Pyruvat aus der Reaktionsmischung physikalisch, chemisch und/oder enzymatisch entfernt wird.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Umsetzung des Pyruvat in Gegenwart von einer oder mehreren Acetolactat-Synthasen (ALS) zu Acetolactat erfolgt.
6. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Umsetzung des Pyruvat in Gegenwart einer Pyruvat-Decarboxylase zu Acetaldehyd erfolgt.
7. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Umsetzung des Pyruvat in Gegenwart einer Pyruvat-Oxidase zu Acetylphosphat erfolgt.
8. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Umsetzung von Pyruvat in Gegenwart eines thermostabilen Enzyms erfolgt.

- 25 9. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß ein oder mehrere der Transaminasen in immobilisierter Form vorliegen.

Zusammenfassung

Verfahren zur Herstellung von L-Phosphinothricin durch enzymatische Transaminierung mit Aspartat

5

Die Patentanmeldung beschreibt ein Verfahren zur enzymatischen, chiralen Synthese von L-Phosphinothricin durch Transaminierung aus seiner korrespondierenden Ketosäure PPO mit Aspartat als Aminodonor. Durch geeignete Reaktionsführung kann eine quantitative Umsetzung bei Einsatz annähernd äquimolarer Mengen von Aminodonor und -akzeptor unter vollständigem Verbrauch der Donoraminosäure Aspartat erreicht werden. Die Verwendung thermostabiler Transaminasen ermöglicht eine hohe Reaktionsgeschwindigkeit und entsprechend große Raum/Zeit Ausbeuten.

15

